

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-317092

(43)Date of publication of application : 26.12.1988

(51)Int.Cl.

C12P 7/66

// (C12P 7/66

C12R 1:01)

(21)Application number : 62-151059

(71)Applicant : MITSUBISHI GAS CHEM CO INC

(22)Date of filing : 19.06.1987

(72)Inventor : URAGAMI SADAJI
KOGA HIROMI

(54) PRODUCTION OF COENZYME Q10

(57)Abstract:

PURPOSE: To readily, efficiently and stably obtain a coenzyme Q10 useful in a medicine such as heart function-accentuating agent, feed additives, etc., by extracting a bacterium cell obtained by cultivating a coenzyme Q10 producing bacterium belonging to the genus *Oligomonas*.

CONSTITUTION: A bacteria cell is separated and selected from a soil, etc., in a culture medium containing methanol to afford *Oligomonas methanolica* strain exhibiting the following bacteriological and physiological properties: Shape and size of the cell: cocci or short rods, wide, 0.5W0.8 μ m, length, 0.5W1.5 μ m; Gram negative; capable of rearing and propagating in alkaline conditions; capable of reducing nitrate; capable of assimilating glucose and methanol, etc. Then the strain is aerobically cultivated in a culture medium containing about 6wt.% methanol, peptone, etc., at 20W42° C, pH7W10 and 0.5W20ppm dissolved oxygen concentration. Then a bacterium cell is separated from the culture medium and dried and the resultant dried bacterium cell is heated with ethanol, etc., at 50W90° C for about 1hr to provide an extract, which is fractionated with silica gel, etc., and purified to liberate the aimed coenzyme Q10.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

特開昭63-317092 (5)

スとして酸濃もしくは酸液と空気との混合ガスを使用したり、また、培養槽内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、固分培養または連続培養のいずれでもよい。

定常液としてアンモニアを添加した場合に、培養期間中アンモニアが菌体生産のために消費されて培養液のpHが低下する。この場合に、培養液のpHを所定の値に保つために、アンモニア、苛性カリおよび苛性ソーダなどのアルカリを添加するが、アンモニアを添加することが好ましい。

このようにして、菌体を培養したのち、菌体を培養液から分離する。分離には通常の固液分離手段が採用される。すなわち、固液分離手段としては、たとえば、培養液そのものをそのまま遠心分離するなどの手段、培養液中に本菌種よりも大きい他の微生物を濾過剤として加えたり、または、プレコートすることにより培養液から菌体を濾過分離することの手段、培養液に糖などの凝固剤を加えて菌体を凝固させて、この凝固菌体を遠心もしくは遠心分離により培養液から分離するなどの手段、

培養液のpHを5以下にすることにより、または、pHを5以下にしさらに50〜100℃で加熱することにより菌体を凝縮させて、この凝縮菌体を遠心もしくは遠心分離により培養液から分離するなどの手段などを適用し得る。

分離された主要の菌体、または、たとえば、芽胞菌などによる乾菌菌体から細胞素 Q_{10} を抽出し、この細胞素 Q_{10} は必要に応じてさらに精製に付される。

細胞素 Q_{10} の分離、抽出および精製は、培養液 Q_{10} に適用されている通常の分離抽出法および精製法によって行なうことができる。すなわち、たとえば、エタノール、メタノールもしくはアセトンに菌体を懸濁させて、50〜90℃で1時間加熱して抽出して抽出液を得る。または、まず、メタノール、水酸化ナトリウムおよびピロゾールの混合物を用いて、菌体のりん脂質などのりん化性物質をけん化してけん化液を得る。これらの抽出液もしくはけん化液から、たとえば、 γ -ヘキサンのような有機溶媒によって細胞素 Q_{10} を抽出し

て抽出物を得る。ついで、この抽出物から、たとえば、ハイポラースポリマーのような多孔性合成樹脂、シリカゲルおよびフッ化樹脂などを用いて、細胞素 Q_{10} を分離、精製し、精製する。

菌体から得られた細胞素 Q_{10} の同定、定量には、一般に、真菌菌体クロマトグラフィー、元素分析、熔点測定、赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルおよび質量分析などの手段がそれぞれ用いられる。

〔実施例〕

実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。なお、本発明は、実施例に限定されるものではない。

実施例1

オリーブナス メタノリカの菌体の分離

土壌サンプル約0.5〜1gを殺菌水10mlに無菌的に入れ、この懸濁液1mlをメタノール含有寒天平板培地の上に線状にほぼ一線になるように入れ、水分をこの寒天培地に吸収させたのち、28℃で約7日間静置培養を行なった。この寒天培地に生

殖したコロニーの一部をさらにメタノール含有寒天平板培地に培養して得られた単一コロニーを、メタノール含有寒天平板培地に接種して培養して、オリーブナス メタノリカ 0-3、同 0-15 および同 0-108 のそれぞれを得た。

細胞素 Q_{10} の製造

殺菌水1.5あたり、 $(\text{KH}_2\text{PO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3g、 KH_2PO_4 1.8g、 Na_2HPO_4 2.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 28mg、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 30mg、 NaCl 4.0g 5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg、 Na_2CO_3 2.5g、ビタミン2mgおよびメタノール8mlを溶解し、pH9.0に調整した培地（以下 培地Aと記す）30mlを100ml寒天三角フラスコに分注し、120℃で20分滅菌した。寒天20gを添加したメタノール含有寒天培地（ Na_2CO_3 を含まない培地を120℃で20分滅菌し、これに別に殺菌した10重量% Na_2CO_3 水溶液を培地10mlあたり0.25%添加して作成した）で30℃、3日間培養したオリーブナス メタノリカ 0-108（農工研調査第5232号）の1白金耳を100ml寒天三角フラスコの培地Aに

特開昭63-317092 (6)

振盪し、30℃でロータリー・シェーカーで回転数
220回/分の回転無愛培養を行った。この培
養液を懸浮液とした。

工場用水とあり、 (Mn^{2+}) :50、 Fe 、 $\text{Hg}50\text{mg/L}$ 、 1.5g 、 $\text{Ni}0.0\text{g}$ 、 4.5g 、 Pb 、 $\text{Cu}0.0\text{g}$ 、 $\text{Zn}0.0\text{g}$ 、 $\text{Ca}20\text{g}$ 、 20g 、 90mg 、 $\text{Zn}50\text{g}$ 、 40g 、 15mg 、 $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15mg 、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.3mg 、 (Ni^{2+}) 、 $\text{Na}_2\text{O}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg 、 $\text{CoCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg 、 H_2PO_4 1.0g 、 NaCl 50mg 、 K 1 30g をオートクレーンで混合培養槽(増培B)15と30gを培養槽に入れ、緩衝液、アミノ酸水でpH 9.0に調整し、メタノール400ccおよび緩衝液200mlをそれぞれ添加した。増培が増殖するに従って、培養液中のメタノール濃度が低下したが、このメタノール濃度をガスクロマトグラフィーで分析し、培養液中のメタノール濃度が0.1~0.2%に達するようメタノールを補給した。培養温度30℃、培養槽のpH 9.0。培養槽の回転数(混拌羽根の回転数)500 rpm/分および通気量 1vvm で、世代時間(空気を換える)操作操作を行なったところ、増殖(空

しく低減される。

が約4時間で菌数が増殖した。培養を開始してから、48時間後に、培養液を遠心分離し、得られた菌体を凍結乾燥して乾燥固体90gを得た。

この乾燥固体から補酵素Q₁₀を、インプロパノール溶液で90%容積のインプロパノール水溶液で抽出し、ついで、ヘキサン抽出を行ない、得られたヘキサン抽出液中の炭素型結合酵素Q₁₀を順相溶媒で酸化した後、このヘキサン溶液について、高速液体クロマトグラフィーで補酵素Q₁₀を同定し、その含量を測定した。その結果から、乾燥固体1gあたり1.60mgの補酵素Q₁₀が得られたことになる。

〔要項の結果〕

本発明によれば、工業生産により安定して容易に入手し得る物質をも原料として使用することができ、さらに、糊固を供用して、補修容易な容器に、効率よく、しかも、安定して製造することが可能となる。

また、特に、本発明における開孔は、好アルカリ性環境なので培養における腐敗による汚染が著

三 菱 瓦 斯 化 学 株 式 会 社
代 理 人 井 上 小 園 青 木
特 許 出 販 人